高通量种子切片技术研究及其在作物育种中的应用

翟晨光[1]　刘龙飞[1]　姚 远[2]　景海春[3]　卢 洪[1*]

1 中玉金标记（北京）生物技术股份有限公司 北京 102206
2 中国科学院 重大科技任务局 北京 100864
3 中国科学院植物研究所 北京 100093

摘要　近年来，我国在作物育种领域开始应用分子标记辅助育种，自动化种子切片机是影响育种规模的关键设备，相关技术发展非常迅速，未来将提高我国作物育种水平。文章论述了自动种子切片机在作物育种中的意义，国际、国内发展现状及其技术原理，并对我国第一套商业化育种种子切片设备的技术特点进行详细介绍，指明了我国育种种子切片设备的发展方向。

关键词　自动化种子切片机，自动化种子挑选机，分子标记辅助选择，作物育种

DOI　10.16418/j.issn.1000-3045.2018.09.008

我国人口众多，农作物种业是保障国家粮食安全和支撑农业发展的根本所在，已经成为国家战略性、基础性核心产业。作物育种技术的发展将增强我国农业产品竞争力，加快农业现代化，促进我国由农业大国向农业强国转变[1,2]。我国种业技术近几年发展较快，在作物育种领域已经开始推广应用分子标记辅助育种。该技术借助分子标记的基因分型结果，从数万个群体中选择最优的后代用于育种，可缩短育种年限，在有限的空间内扩大育种规模，且群体越大选择效率越高。但随着育种规模的扩大，用于分子检测的样品取样效率和质量成为分子辅助育种的技术瓶颈。传统的做法是把育种群体的种子全部种植到实验田里，从田间进行叶片取样，然后进行基因型检测分析并决定取舍。该做法存在着占地面积大、耗时长、效率低、易出错的问题，并且在田间种植的育种群体中有 80% 以上植株的基因型不符合预期，早晚要被淘汰掉，这严重地浪费了育种资源和育种者的精力。有了种子切片机的帮助，在播种前，利用种子切片技术对种子进行微量取样，通过分析微量样品的分子标记信息即可获得相应种子的基因型信息，然后只需将符合预期基因型的种子种植田间，即在播种之前完成了基因型选择，这样就大大缩小了群体种植

*通讯作者
资助项目：中国科学院战略性先导科技专项（A类）（XDA08040200）
修改稿收到日期：2018年8月26日

规模，不仅节省了大量的田间工作而且让育种者更加专注于复杂农艺性状和产量性状的选择。高通量种子切片机的制造技术原来一直被国际种业公司垄断，并且不对外提供任何服务。切片技术的落后成为我国实施分子标记辅助育种的一大障碍。

为了打破国际种业公司在该领域的技术垄断，中玉金标记（北京）生物技术股份有限公司（以下简称“中玉金标记”）与中国科学院植物研究所合作进行了 2 年多的联合攻关，终于取得了具有自主知识产权、可以投入商业化使用的种子微创取样设备——玉米种子切片机，且设备集成化、自动化程度非常高，占地面积不到 4 平方米。该设备将准备好的样品倒入储料斗，并与收集用的 96 孔板集中放入便携式 96 孔板篮，之后只需启动运行程序，设备就自动完成从单粒分拣到最后收集的所有过程。整套设备操作方便快捷、切割精确快速、样品收集准确无误。玉米种子切片一次操作处理 960 粒种子，每 6 秒可完成一粒种子取样，成功率达 95% 以上，田间成活率达 95% 以上。

玉米种子切片机是我国自主研发的、具有自主知识产权的、高通量自动化的大型科研设备，该设备的商业化标志着我国已经成功地打破了国际公司在该技术领域的垄断，实现了中国创造和中国制造。并且我国分子育种技术已经突破了种子高通量取样的技术瓶颈，这对我国的分子育种技术发展和实施具有重要意义。该技术的成功研发也是我国科研单位（中国科学院植物研究所）与企业（中玉金标记）共同努力的结果，是我国科企联合政策结出的硕果。

1 种子切片技术发展现状

1.1 国际现状

分子育种技术发展带动着新的育种模式的形成。种子切片技术是作物分子育种过程中一项关键性的技术，取样质量和效率影响着育种规模[3-5]。国际育种公司早已意识到种子切片设备在作物分子标记辅助选择育种中的应用价值，并开始研发相关技术。2007 年，美国孟山都公司公布了种子切片技术（chipping process）在玉米、大豆育种中的应用。它利用光谱进行种子定向，用激光或机械刀片对籽粒进行精确切割，切下的切片用 96 孔板收集，每天可以处理上万粒种子[6]。种子切片技术的应用，将多性状整合育种（multiple trait integration，MTI）中的种子性状，由原来的 8 个增至 20 个[3]。2008 年，美国杜邦旗下的先锋高级育种国际有限公司（以下简称“先锋公司”）公布种子微创切片技术（又称“激光辅助选种技术”，laser-assisted seed selection），通过将磁性漆喷涂在种子顶部表面定位，然后用激光射线切取籽粒顶部少量胚乳组织，取样后的种子仍保持发芽活性[6,7]。

国际种业大公司非常重视种子切片技术的垄断，并通过它来限制竞争对手扩大育种规模。他们通常在研发成功某项种子切片技术后马上对相关技术进行专利申请，并限制相关技术研发。2012 年，孟山都公司在美国圣路易斯联邦地方法庭对先锋公司的“激光辅助选种”提出侵权诉讼，虽然二者最终和解，但他们仍制约着这项技术的进一步使用[8]。由于国际种业大公司在种子切片技术方面的先发优势、垄断地位、自行研制使用等原因，国际市场上至今还没有商品化的种子切片设备。

1.2 国内现状

为打破国际种业大公司在种子切片技术上的垄断，我国研究单位和种业公司开始着手研发自主种子切片设备，主要有中国科学院合肥物质科学研究院、中国科学院沈阳自动化研究所、沈阳理工大学、中国农业大学、中玉金标记和河南农业大学等，相关技术研发进展迅速。2014 年，李露等[9]发明了一种利用激光进行种子切片的全自动种子切片机；2015 年，王喜庆等[10]发明了“高通量种子自动化取样及阳性种子挑选系统及方法”，描述了通过激光进行切割种子自动取样的设备和方法，并获得国家知识产权局授权；同年，魏英姿等[11]发明了一种双层转盘式育种激光自动切片取样机，并获得国家专利授权；2016 年，杨小东[12]在其毕业论文中描

述了利用激光自动切割种子取样的方法；同年，河南农业大学李慧琴等[13]发明了玉米育种自动取样机并获得国家专利授权；2017 年，谷侃锋等[14]发明玉米育种取样自动切片机，可利用神经网络模式进行玉米种子识别定位，再用激光进行切割，并获得中国专利授权。目前，我国自主研发的种子切片相关技术已经在国家知识产权局提交20多项相关专利申请，其中10余项已经获得中国专利授权。然而，到目前为止，只有中玉金标记做出了成熟的、可以量产的高通量种子切片机。

在 2017 年第四届国际农业基因组大会上，中玉金标记公布了我国第一套商品化的玉米种子切片和挑选设备[15]，为玉米分子育种提供了种子处理的全套技术解决方案，它包括全自动种子微创取样设备、种子挑选设备和相应的信息管理系统。种子微创取样设备可以对每一代分离群体进行种子批量取样，微创后的种子活力不受影响；通过检测微量样本获得种子的遗传信息后，玉米种子挑选设备根据种子基因型信息自动把目标种子从海量的群体中挑选出来；在管理系统中，微创种子、切片样本和基因型一一对应，可以对种植在大田中的每一株种苗进行跟踪。全自动种子切片系统与高通量分子检测技术相结合，形成一套完整的作物分子辅助选育技术方案（图 1），标志着我国分子育种在群体取样技术和目标种子挑选技术方面已经突破了“瓶颈”，达到一个新的水平。

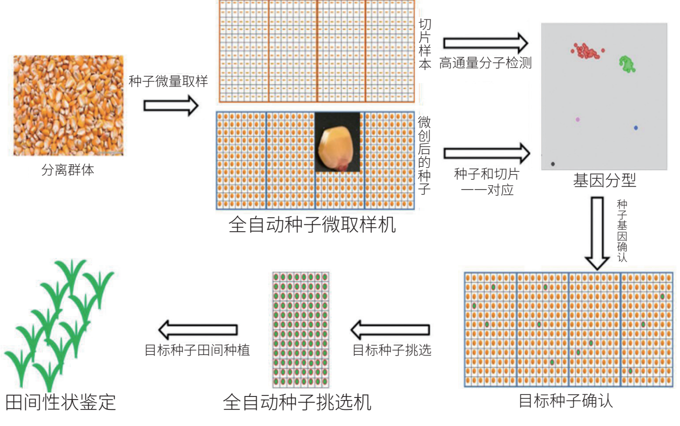


图 1　高通量分子标记辅助选择育种流程

2 高通量种子切片技术

分子标记辅助选择育种是利用分子标记与目标性状基因紧密连锁的特点，从育种群体中筛选具有目的性状的个体，可有效减少育种个体数量，缩短育种周期，从根本上解决了传统育种性状鉴定不准确、成本高和周期长的问题[16-18]。在 21 世纪初，国际种业公司如孟山都、先锋公司等已经采用新一代的单核苷酸多态性（SNP）分子标记检测技术，它具有检测快速、成本低、通量大的特点[6,19]。随着分子检测技术的发展和育种规模的扩大，群体取样已经成为分子标记辅助选择育种的瓶颈。田间叶片取样存在着效率低、易出错的问题，并且在田间种植的育种群体中有 80% 以上植株在苗期被丢弃，严重地浪费了育种资源。在播种前，利用种子切片技术对种子进行微量取样，通过分析样品可获得种子的遗传信息，而后将所期望基因型的种子种植于田间，这样则大大缩小了群体种植规模。

自动种子切片技术与高通量分子检测技术相结合，已经形成一种新的育种模式，从而可从数万籽粒中选出最优的一粒参与育种，使育种效率和规模成倍提高[7,18]。规模化育种群体产生的种子数量巨大，而其中的优质种子极少，这就要求种子切片机自动化程度高，能从大量的种子中分离出单粒种子；然后对单粒种子逐一进行准确识别和特定部位精确切割，以保证后期种子较高的成活率；最后对取得的微量样品和切片后的种子准确无误地进行一一对应收集，以保证通过样品获得的基因型和种子相对应。

一个典型的全自动种子切片设备主要包括自动供料装置、种子方向识别装置、种子抓取转移装置、取样装置、样品收集装置以及控制和信息管理系统 6 个部分（图 2）。在信息管理控制的指挥下，自动供料装置从批量的种子中分离出单粒种子；再经过种子方向识别后，调整种子方向运输至取样平台；然后对种子进行精确取样，收集装置将样品和微创种子一一对应进行收集[7,9,10,13,14,20]。

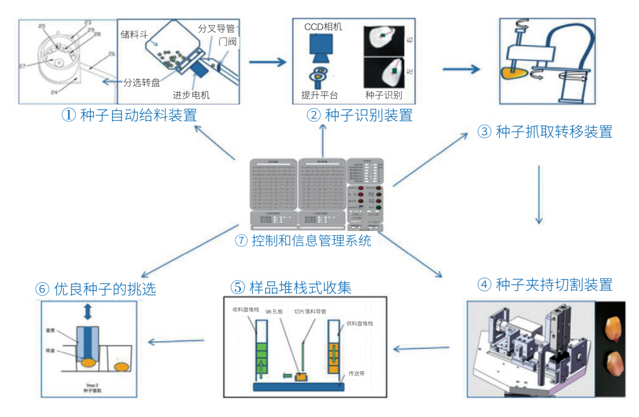


图2　玉米种子切片机原理

（1）自动供料装置。自动供料装置将待取样种子批量装载，并进行单粒种子分离运输至种子识别平台。其最主要的功能是单粒种子分离，主要采用的方法有旋转盘分离法和振动盘分离法。旋转盘分离法是通过圆盘旋转把其凹槽中的单粒种子从批量种子中分离出来[7,20,21]，但这种方法仅适用于形状较为规则、颗粒较大的种子，如玉米和大豆等；而振动分离盘很好地解决了种子外形的问题，它利用螺旋转盘高频振动使批量种子处于单层平面排列状态，然后通过转盘的螺旋转动使种子由平面排列变为线性排列，单粒种子逐渐分离出来（图3）[9-11,13]。

（2）种子方向识别装置。对单粒种子进行方向识别，以利于随后操作过程中种子抓取、定位和精确切割。主流的种子方向识别方法是通过计算种子外形某些特征来判断方向[13,19]。这种方法主要用于形状规则且特征明显的种子，但对于玉米穗两端籽粒、籼稻籽粒等外形不规则或特征不明显的种子并不适用，而最新的图像智能识别技术可以解决这一问题。李广伟等[18]利用神经网络模式识别工具箱建立的模型，对玉米种子姿态识别准

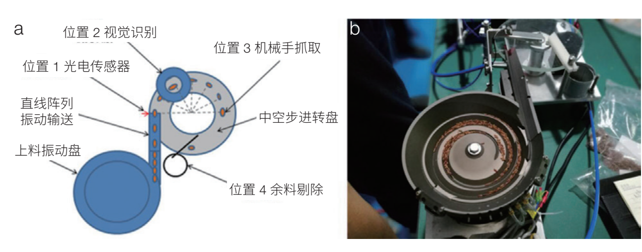


图3　种子振动分离盘的原理（a）与实物（b）

确率达99%以上，中玉金标记利用人工智能识别技术对籼稻籽粒方向进行识别，准确率达99%（内部数据）。先锋公司在玉米激光切片技术上采用另一种方式，在种子顶端涂抹铁基粉，通过磁性吸附种子顶端直接调整玉米种子方向[7]。

（3）种子抓取转移装置。抓取已经确定好方向的种子，然后转移至取样装置上，并在这一过程中调整种子方向，便于取样装置对种子精确取样。对于易于抓取的种子一般采用类似于钳子的装置直接抓取，对于近似椭圆的种子（如玉米、大豆等）一般采用真空吸附的方式进行种子吸附。转运方式一般采用传送带或多轴机器人的方式。

（4）取样装置。固定种子并对种子进行精确取样的装置。根据种子形状的不同，固定方式多种多样，其中通过“V”型装置对种子挤压可以有效固定大多数种子。取样方式主要有机械切割和激光切割两种。需要根据不同的籽粒质地及形状选取不同的方法。中玉金标记玉米种子切片机采用复合的机械方式取样，用圆形锯从种子顶端下方切割2/3，再以自上而下的冲切方式将种子样品直接冲切至漏斗形收集导管。这种复合切割方式既避免了单一冲切方式的巨大冲切力对玉米硬质籽粒的伤害，又避免了单一圆形锯切割方式在完成切割后样品切片落点不固定性的问题[21]。

（5）样品收集装置。将切割后的种子和切片样品，通过管道收集并储存的装置。为准确记录样品和种子的对应关系，多采用96孔板进行储存；为加大取样通量，最好加装自动叠板。另外，必须有相应的信息管理系统记录收集过程中种子和切片的对应关系信息，以便需要时进行数据追溯。

（6）控制和信息管理系统。控制系统主要是精确控制种子分拣、识别、运输、切割和收集等各个环节的相互关系，使整个取样流程有序进行，除此之外还有红外监测、故障报警等功能。信息管理系统主要是用来记录整个取样流程中的各种信息，如故障信息、收集样品储

存信息、切片后种子储存信息、样品和种子的对应关系等，以保障取样信息的可追溯性。

3 总结

在市场需求的驱动下，我国有多家单位投入到种子切片机的研发中，目前已有商品化的产品投入市场。但与国外种业大公司相比，在使用经验和产品成熟度上还有很大的差距。并且，与国外自行研发使用不同，我国商品化种子切片机需要更强的适用性，这给我们提出更大的挑战。目前，中玉金标记联合中国科学院植物研究所已经成功研发出了玉米种子切片机，在水稻、小麦、大豆方面的种子切片机也在研发调试中，期望在不久的将来能够推出商业化的相关切片设备，为中国种业的分子标记辅助育种做好服务。随着我国作物分子标记辅助育种技术的发展和应用范围的扩大，种子切片机在主要作物育种领域将有广阔的应用前景。因此，我们必须在借鉴国外成功经验基础上，立足我国国情，研发出适合中国市场的产品，促进分子标记辅助育种技术在我国的推广应用。

参考文献

1 中华人民共和国国务院. 国务院关于加快推进现代农作物种业发展的意见国发〔2011〕8号. [2011-04-18]. http://www.gov.cn/zwgk/2011-04/18/content_1846364.htm.

2 农业部. 全国现代农作物种业发展规划（2012—2020年）. [2013-01-11]. http://jiuban.moa.gov.cn/zwllm/zcfg/flfg/201301/P020130111536985405855.doc.

3 Ping T, Sun X, Mumm R H. Optimized breeding strategies for multiple trait integration: II. Process efficiency in event pyramiding and trait fixation. Mol Breeding, 2014, 33: 105-115.

4 Wu L, Wang C. Application of molecular marker assisted selection in gene pyramiding and selection of new cultivars. Journal of Northeast Agricultural University, 2011, 18(1): 79-84.

5 李向拓, 毛建昌, 吴权明. 分子标记在玉米育种中的应用. 玉米科学, 2004, 12(1): 26-29.

6 中国种子协会赴美考察团. 美国农作物种业的考察报告. 种子世界, 2012, (3): 17-22.

7 先锋高级育种国际公司. 用于对来自单粒种子的种子组织的定向、取样及收集的方法、过程与自动化装置: 中国, 102095600A. 2011-05-15.

8 世界农化网中文网. 杜邦和孟山都就种子切片专利诉讼达成和解. [2014-12-25]. http://cn.agropages.com/News/NewsDetail---8656.htm.

9 中国科学院合肥物质科学研究院. 一种自动种子取样机: 中国, 104458319A. 2014-11-26.

10 中国农业大学. 高通量种子自动化取样及阳性种子挑选系统及方法: 中国, 105424405A. 2016-03-23.

11 沈阳理工大学. 一种双层转盘式育种激光自动切片取样机: 中国, 105537777A. 2016-05-04.

12 杨小东. 作物种子取样自动化设备的设计与优化. 合肥: 合肥工业大学, 2016.

13 河南农业大学. 一种玉米育种自动取样机: 中国, 206399685U. 2017-07-12.

14 中国科学院沈阳自动化研究所. 玉米育种取样自动切片机: 中国, 205414714U. 2017-09-26.

15 中玉金标记（北京）生物技术股份有限公司. 采样切割装置及种子自动切片采样设备: 中国, 106226117A. 2017-01-11.

16 方宣钧, 吴为人, 唐纪良. 作物DNA标记辅助育种. 北京: 北京出版社, 2001: 1-8.

17 Ribaut J M, Hoisington. Maker-assisted selection: new tools and strategies. Trends in Plant Science, 1998, 3: 236-239.

18 李广伟, 谷侃锋, 赵明扬. 育种用玉米种子切片取样自动定向方法与试验. 农业工程学报, 2016 , 32(4): 40-47.

19 李筠. SNP分子标记及其在水稻研究中的应用. 农业与技术, 2016, 36(7): 32-33.

20 孟山都技术有限公司. 自动种子取样器及对种子进行取样、试验并散装的方法: 中国, 102742394A. 2012-10-24.

21 中玉金标记（北京）生物技术股份有限公司. 分拣装置及种子自动采样设备: 中国, 106217432A. 2016-12-14.

Advances in Seed Chipping Technology and Its Applications in Crop Breeding

ZHAI Chenguang[1] LIU Longfei[1] YAO Yuan[2] JING Haichun[3] LU Hong[1*]

（1 China Golden Marker (Beijing) Biotech Co., Ltd., Beijing 102206, China;

2 Bureau of Major R&D Programs, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100864, China;

3 Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093, China）

Abstract In recent years, crop molecular maker assisted selection has been developing rapidly in China. Automatic seed chipper is the key equipment that affects the breeding scale and speed. The related technology is developing very fast, and will improve the level of crop breeding in the future. Here we introduce the value of automatic seed chipper in crop breeding, the domestic and international development status and technical principle. We also describe the technical characteristics of China's first commercial breeding seed chip equipment in detail, and point out the development in our breeding seed chip equipment.

Keywords automatic seed chipper, automatic seed picker, molecular marker assisted selection, crop breeding

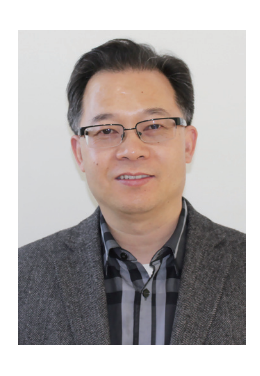


翟晨光 中玉金标记（北京）生物技术股份有限公司分子标记科学家、研发部经理。2003 年毕业于华南热带农业大学，获硕士学位。曾任先正达生物（中国）科技有限公司植物分子平台科学家，负责Assay 开发、植物基因表达和拷贝数检测。长期从事作物分子育种相关技术研发，已发表外文文章2篇，申请相关专利16项。现主要负责标记开发、分子检测方法、分子育种设备等研发工作。E-mail: chenguang.zhai@cgmb.com.cn

ZHAI Chenguang Molecular maker scientist and innovation and cooperation manager in China Gold Maker (Beijing) Biotech Co., Ltd.. He received Master degree from Tropical Agricultural University of South China in 2003, worked as associate researcher of molecular platform in Beijing WMKT agricultural Biotech Corp in 2003–2009, engaged in the research on molecular design, functional gene and plant genetic transformation. In 2009–2014, as molecular biology scientist he worked with Syngenta Biotechnology (China) Co. Ltd., engaged in assay development and assaying plant gene expression and gene copy number. From 2014 till now, he has been molecular maker scientists and innovation and cooperation manager in China Gold Maker, responsible for research on plant molecular breeding technology, such as molecular markers, molecular detection methods, molecular breeding equipment, and so on. In these years, he has applied for 16 patents and published 2 articles related to crop molecular breeding in foreign language.

E-mail: chenguang.zhai@cgmb.com.cn

*Corresponding author



卢 洪 中玉金标记（北京）生物技术股份有限公司CEO兼首席科学家，博士，“千人计划”创新专家，北京市“海聚工程”特聘专家，中国农业大学客座研究员。在美国普渡大学取得植物遗传育种学博士学位，并曾在康奈尔大学做博士后研究。长期从事农作物分子标记技术和分子育种的研发，尤其是在QTL mapping、GWAS、杂种优势、数量遗传学等方面有丰富的研究经验，并有4项国际专利和6项国内专利，发表SCI论文10余篇。曾任杜邦先锋公司分子标记实验室经理、先正达公司中国区玉米研发总监、全球水稻生物技术总监等职。

E-mail: hong.lu@cgmb.com.cn

LU Hong Ph.D., CEO and CTO of China Golden Marker (Beijing) Biotech Co. Ltd., China central government Thousand Talents Recruitment title list, Beijing municipal Oversea Talents Recruitment program title list, visiting professor of China Agriculture University. Dr. Lu earned his Ph.D. degree from Purdue University in Plant Genetics and Breeding, and conducted post doctorate training at Cornell University. He is specialized in crop molecular marker technology and molecular breeding, particularly in QTL mapping, GWAS, heterosis, and quantitative genetics. He holds 4 international patents and 6 China patents, and has published over 10 SCI indexed papers. Dr. Lu used to work for DuPont-Pioneer as its molecular marker lab manager. He also worked for Syngenta as its China Corn PD Head, and Global Rice Biotech Program Head, respectively. E-mail: hong.lu@cgmb.com.cn

■责任编辑：文彦杰